



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0071777
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 10월 15일
Date of Application OCT 15, 2003

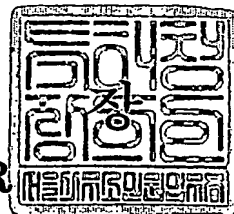
출원인 : 주식회사 케이엠에스아이
Applicant(s) KMSI CO., LTD



2004 년 10 월 18 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.23
【제출인】	
【명칭】	주식회사 한국의과학연구소
【출원인코드】	1-2000-031188-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2003-051697-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0071777
【출원일자】	2003.10.15
【심사청구일자】	2003.10.15
【발명의 명칭】	연골재생제로서 아피제닌을 함유하는 골관절염 치료 조성물
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2004-0020447-30
【발송일자】	2004.01.24
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 손민 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

20030071777

출력 일자: 2004/10/19

【첨부서류】

1. 보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

관절 연골 조직 및 활액에서의 농도가 1 내지 80 μM 이 되도록 하는 양의 아피제닌 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유함을 특징으로 하는 연골재생용 조성물.

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 정정

【보정내용】

(삭제)

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

(삭제)

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.20
【제출인】	
【명칭】	주식회사 한국의과학연구소
【출원인코드】	1-2000-031188-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2003-051697-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0071777
【출원일자】	2003.10.15
【심사청구일자】	2003.10.15
【발명의 명칭】	연골재생제로서 아피제닌을 함유하는 골관절염 치료 조성물
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0384060-20
【접수일자】	2003.10.15
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 손민 (인)

20030071777

출력 일자: 2004/10/19

【수수료】

【보정료】	0	원
【추가심사청구료】	0	원
【기타 수수료】	0	원
【합계】	0	원

【보정대상항목】 식별번호 161

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 실시예 결과는 도 12에 제시하였다. 정상일 때의 NF κ B의 양을 100이라고 보면 LPS 처리시 186까지 증가하지만, 아피제닌을 같이 처리하면 최대 111(20 μ M 아피제닌 처리시)로 낮아지는 효과를 볼 수 있었다.

본 발명은 구체적인 양태로 기술되어져 있으나, 전술한 명세서 및 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 이로써 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 발명의 범위내에서 다른 양태, 장점 및 변형들은 본 발명이 속하는 분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

본 발명은 2003년도 두뇌한국21(Brain Korea 21) 사업에 의해 지원되었습니다.

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.10.15
【발명의 명칭】	연골재생제로서 아피제닌을 함유하는 골관절염 치료 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition for treatment of osteoarthritis containing apigenin as chondroregenerative agent
【출원인】	
【명칭】	주식회사 한국의과학연구소
【출원인코드】	1-2000-031188-1
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2003-051697-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박창신
【성명의 영문표기】	PARK, Chang Shin
【주민등록번호】	600116-1036616
【우편번호】	406-130
【주소】	인천광역시 연수구 동춘동 924번지 럭키아파트 104동 303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강주희
【성명의 영문표기】	KANG, Ju Hee
【주민등록번호】	710221-1932611
【우편번호】	407-061
【주소】	인천광역시 계양구 작전1동 풍림 아이원 아파트 102동 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김경미
【성명의 영문표기】	KIM, Gyoung Mi
【주민등록번호】	710122-2063617

【우편번호】 157-010
【주소】 서울특별시 강서구 화곡동 430-9
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 손민 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 33 면 33,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 9 항 397,000 원
【합계】 459,000 원
【감면사유】 중소기업
【감면후 수수료】 229,500 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류[사업자등록증, 원천징수 이행상황신고서]_2통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 연골 파손의 마커가 되는 관절활액 총 용적과 활액의 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘 양을 감소시키는 효과, 활액막 세포의 상태를 호전시키는 효과 및 연골조직을 재생시키는 효과를 갖는, 아피제닌의 관절 연골재생제로서의 신규한 용도를 제공한다. 또한, 관절 연골재생제로서 아피제닌을 포함하는 골관절염 치료제 및 이를 사용한 골관절염 치료 방법을 제공한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

아피제닌, 연골재생제, 관절활액, 프로테오글리칸, 프로스타글란딘, 일산화질소, 소염, 진통, 골관절염

【명세서】

【발명의 명칭】

연골재생제로서 아피제닌을 함유하는 골관절염 치료 조성물 {Composition for treatment of osteoarthritis containing apigenin as chondroregenerative agent}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 골관절염 유발 토끼 모델에서 식염수 처리 대조군(A), 및 본 발명에 따른 아피제닌 처리 실험군(B)에서의 연골부위의 사진이다.

도 2는 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 본 발명에 따른 아피제닌 투여에 따른 관절활액 총량의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 '정상'은 정상 토끼에서의 관절활액 총량을 의미하고, 'OA'는 골관절염 유발 직후 관절활액 총량을 의미하며 플러스(+) 및 마이너스(-)는 각각 아피제닌 및 식염수가 처리된 오른쪽 다리와 처리하지 않은 왼쪽 다리에 대한 결과를 나타낸다.

도 3은 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 본 발명에 따른 아피제닌 투여에 따른 관절활액 내 프로테오글리칸 총량의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 '정상'은 정상 토끼에서의 관절활액 내 프로테오글리칸 총량을 의미하며, 'OA'는 골관절염 유발 직후 관절활액 내 프로테오글리칸 총량을 의미하며 (+) 및 (-)는 상기와 동일하다.

도 4는 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 본 발명에 따른 아피제닌 투여에 따른 관절활액 내 총단백질량의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 '정상'은 정상 토끼에서의 관절활액 내 총단백질량을 의미하며, 'OA'는 골관절염 유발 직후 관절활액 내 총단백질량을 의미하며 (+) 및 (-)는 상기와 동일하다.

도 5는 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여에 따른 관절활액내 프로스타글란딘E2의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 '정상'은 정상 토끼에서의 관절활액내 프로스타글란딘E2 총량을 의미하며, 'OA'는 관절염 유발 직후 관절활액내 프로스타글란딘E2 총량을 의미하며, (+) 및 (-)는 상기와 동일하다.

도 6은 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여에 따른 관절활액내 콜라겐의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 '정상'은 정상 토끼에서의 관절활액내 콜라겐 총량을 의미하며, 'OA'는 골관절염 유발 직후 관절활액내 콜라겐 총량을 의미하며, (+) 및 (-)는 상기와 동일하다.

도 7은 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여에 따른 맨킨스 점수(Mankin's scoring)의 변화를 나타낸 그래프이며, 이때 (+) 및 (-)는 상기와 동일하다.

도 8은 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여(8a) 및 식염수 투여(8b)에 따른 관절의 연골조직 부위의 염색사진이며, 이때, 'H&E'는 헤마톡실린 및 에오신 염색 처리군을 의미하고, 'Saf-O'는 사프라닌-O 염색 처리군을 의미한다.

도 9는 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여(A) 및 식염수 투여(B)에 따른 관절의 활액막(synovium membrane)의 상태를 나타낸 염색사진이다.

도 10은 골관절염 유발 토끼 모델에 대한 아피제닌 투여에 따른 관절의 활액막 내벽세포(synovium membrane lining cell) 수의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 11은 마우스 유래 대식세포 RAW 264.7에서 LPS에 의해 염증 유발시 본 발명에 따른 아피제닌 투여에 따른 iNOS, COX-2, 및 I κ B α 의 발현 변화를 나타내는 웨스턴 블롯팅 사진이며, 이때 β -액틴은 실험에 사용된 단백질량을 확인하기 위한 마커로 사용된다.

도 12는 마우스 유래 대식세포 RAW 264.7에서 본 발명에 따른 아피제닌 투여에 따른 전사조절인자 NF κ B 단백질과 조절 유전자와의 결합정도의 변화를 나타내는 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay) 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 13> 본 발명은 연골 파손의 마커가 되는 관절활액 총 용적과 활액의 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘 양을 감소시키는 효과, 활액막 세포의 상태를 호전시키는 효과 및 연골조직을 재생시키는 효과를 갖는, 아피제닌의 관절 연골재생제로서의 신규한 용도, 및 관절 연골재생제로서 아피제닌을 포함하는 골관절염 치료제 및 이를 사용한 골관절염 치료 방법에 관한 것이다.
- 4> 관절염은 나이가 들면서 누구에게나 발생할 수 있는 흔한 질병으로 국내의 경우 전체 인구의 약 20% 정도가 관절염으로 고통받고 있는 것으로 알려져 있다. 관절염의 세부 종류는 100여 개에 이르지만, 이중 골관절염이 전체 관절염의 대부분을 차지한다.
- 5> 골관절염은 관절의 연골이 닳아 없어져 관절뼈가 맞부딪치면서 통증을 유발하기 때문에 관절 주변의 근육을 쓰지 않게 되어 힘도 점차 빠지게 되는 질환이다. 골관절염은 과거에 퇴행성 관절염이라고 알려진, 사람에게 흔히 발생하는 관절 질환으로서 관절의 이상 또는 손상 후에 발생하거나, 관절 손상을 받지 않고도 발생할 수 있다.

- <16> 골관절염은 남녀 모두에서 비슷한 유병율을 보이나, 여성에서는 침범되는 관절 수가 더 많고 남성의 경우에는 고관절에 침범되는 경우가 많은 것으로 알려져 있다. 골관절염의 위험인자로는 노령, 비만, 관절 이형성증, 외상, 관절염의 과거력, 일부 특수 직업군 및 가족력 등을 들 수 있다. 골관절염은 그 자체로서 생명에 큰 지장을 주는 것은 아니지만, 만성적인 골관절염의 지속으로 인해 통증 및 관절의 기형이 유발되어 삶의 질이 저하될 수 있다. 특히, 무릎의 골관절염은 만성적으로 신체 불구를 유발하는 가장 큰 원인으로 알려져 있으며, 최근에는 많은 연구 성과로 다양한 약물과 치료법이 개발되어 있어 골관절염에 의한 통증과 관절 기형은 줄일 수 있게 되었다.
- <17> 골관절염의 원인은 관절 연골이 손상되어 연골이 닳아 없어지고 그 밑의 뼈도 손상되어 기형적으로 뼈가 재생되면서 여러 증상이 나타나기 때문이다. 골관절염 발생 병인은 두 가지로 생각할 수 있는데, 첫째, 관절의 연골이나 뼈는 정상적인데 관절에 과도한 부하가 걸려 관절 조직이 손상을 받거나, 둘째, 부하는 정상적인데 비해 관절의 연골이나 뼈가 약한 경우이며, 가장 중요한 위험인자는 연령으로 60세 이상에서는 약 50%, 65세 이상에서는 약 70%의 노인층에서 골관절염이 발생하는 것으로 알려져 있다.
- <18> 골관절염은 주로 무릎과 고관절, 척추, 손가락 등에 발생하며 주요 증상은 통증과 관절의 변형으로, 침범된 관절은 부종, 열감, 관절의 이상비대의 증상을 나타낸다.
- <19> 최근에 다양한 약물과 치료 방법이 개발되어 골관절염 치료에 사용되고 있으나, 치료의 주 목적은 통증 완화, 관절 기능의 유지, 및 관절의 기능장애에 의한 불구를 예방하는데 있다.

- 20> 이러한 골관절염의 치료 방법으로, 비교적 초기에 통증만 있는 경우에는 단순 진통제를 복용하여 통증을 없애는데 초점을 맞추고 있고, 좀 더 진행되고 통증이 지속되면 항염 효과가 강한 소염진통제를 사용하게 된다. 그러나, 이런 소염진통제는 장기간 사용시 위, 간, 신장에 악영향을 미칠 수 있고 연골세포의 재생 능력을 저해시키는 등의 부작용이 있어 사용상 주의가 요한다.
- 21> 보다 구체적으로, 골관절염은 코르티코스테로이드(corticosteroid) 유형의 소염물질, 예를 들면, 프로스타글란딘 합성 저해 기능을 갖는 하이드로코르티손(hydrocortisone) 및 베타메타손(betamethasone) 등을 사용하여 치료되어져 왔으나, 이러한 스테로이드계 호르몬의 경구투여는 일시적으로 효과가 있을 수 있지만 그 심각한 부작용 때문에 사용시 지속적인 주의 관찰과 함께 경구 투여가 아닌 관절내 주사를 원칙으로 한다.
- 22> 관절염 치료에 가장 일반적으로 사용되는 방법은 약물을 복용하는 것으로, 지금까지 많은 진통 및 소염 효과를 가진 약들이 많이 개발되어져 왔으며, 대표적으로 디클로페낙(diclofenac), 아스피린(aspirin) 및 이부프로펜(ibuprofen) 등의 비스테로이드성 소염제(NSAID)가 이에 해당된다.
- 3> 그러나, 관절염 치료에 흔히 사용되는 NSAID는 소화기, 특히 위장에 부작용을 일으키는 문제점을 갖고 있는데, 이는 위장 내벽을 보호하는 효소인 사이클로옥시게나제 1(cyclooxygenase 1, COX-1)과 통증 및 염증을 일으키는 효소인 사이클로옥시게나제 2(cyclooxygenase 2, COX-2)를 한꺼번에 억제하기 때문이다. 또한, NSAID를 장기 복용하는 경우 위장이나 소장내 속쓰림이나 궤양을 유발하고 이는 결국 천공을 유발시킨다. 또한, 야기된 궤양은 위(胃)의 출구를 막아 구토와 체중 감소 등을 야기할 뿐만 아니라, 위장과 십이지장

등의 출혈을 야기시킨다. 그외에, COX-1을 억제하지 않는 COX-2 억제제와 같은 진통효과가 뛰어나고 궤양과 출혈 등의 부작용이 적은 관절통증 치료제가 또한 일부 개발되어져 있다.

24> 이와 같이, 골관절염은 노화로 인해 일어나는 가장 보편적인 현상으로, 과거에는 주로 골관절염에 대한 근본적인 치료제 없이 통증 및 염증만을 제거하는데 초점을 맞춰왔으나, 최근에 연골세포 파손을 감소시킴으로써 관절염의 진행을 늦추거나 억제하는 치료 방법에 대한 연구 성과가 일부 나오고 있다.

25> 예를 들면, 미국 특허 제6,610,750호는 레인(rhein) 화합물 및 ¹의 에스테르 유도체인 디아세레인(diacerein)을 사용하여 관절 연골의 파손을 지연시켜 골관절염을 치료하는 방법을 개시하고 있습니다.

26> 또한, 미국 특허 제5,591,740호는 해양 해면동물 히메니아시돈(hymeniacidon)으로부터 분리된 데브로모히메니알디신 (debromohymenialdisine)을 사용하여 관절 악화 및 연골 분해를 지연시켜 골관절염을 치료하는 방법을 개시하고 있다.

27> 또한, 미국 특허 제6,552,006호는 제니스테인(genistein), 허비마이신 A(herbimycin A), 4,5-디아닐리노프탈이미드(4,5-diaailinophthalimide), 쓰르포스틴 AG82 및 AG556 (thrphostin AG82 and AG556) 같은 단백질 티로신 키나제 억제제(protein tyrosine kinase inhibitor)가 인 터류킨-1 자극된 연골 분해를 지연시킨다는 것을 확인하여 이를 사용한 골관절염 치료 방법을 개시하고 있다.

28> 또한, 미국 특허 제5,650,433호(일본특허공보 제JP 07-025761호의 상용특허)는 관절 연골 매트릭스의 주요 성분인 프로테오글리칸의 고갈을 억제하는 기능을 갖는 플라보노이드 화합

물 또는 글리코사이드 화합물, 또는 이의 스테레오이성체를 함유하는 연골보호제 및 이를 이용한 관절증의 치료 방법을 개시하고 있다.

29> 그러나, 상기 언급된 특허문헌들 및 현재까지 알려진 약물을 사용한 골관절염 치료 방법에서 개시된 방법들은 연골 파손 과정의 진행을 지연시키거나 억제시킬 뿐, 연골 조직을 재생시키는 효과(chondroregenerative effect)를 갖고 있어 손상된 연골 조직을 회복시킬 수 있는 근본적인 치료제를 개시하지는 못했다.

30> 최근에는, 골관절염 치료에 있어서 부작용을 갖고 있는 약물을 사용하여 연골을 보호하는데 따른 어려움을 회피하고자, 사람 간엽모세포(mesenchymal stem cell)를 사용하여 연골조직을 재생시키는 방법과 같은 약물을 사용하지 않는 다른 방법들이 또한 시도되고 있다[예를 들면, 유럽공개공보 EP 제0989855A1호 및 미국출원공보 US 제20020110544A1호 참조].

31> 따라서, 현재까지도 골관절염 치료에 있어서, 소염 및 진통 효과를 제공하거나 연골 파손을 지연 또는 억제하는 치료법만이 골관절염의 임상적 진행을 지연시키는데 사용되어지고 있어, 연골 분해에 의해 유발된 골관절염의 치료를 위해 연골 조직을 재생시키거나 연골 조직 상태를 개선시킬 수 있는 신규한 치료 방법이 개발되어야 할 필요성이 여전히 요구되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

2> 본 발명은 천연 플라보노이드계 물질인 아피제닌 화합물이 연골세포 파손을 지연시키는 공지된 효과 뿐만 아니라, 연골세포의 증식을 촉진하여 연골 조직을 재생시킬 수 있다는 아피제닌의 신규한 용도를 발견하였으며, 이로써 본 발명을 완성하였다.

- 33> 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 세포독성 없이 연골세포의 증식을 촉진시키기에 유효량의 아피제닌 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 연골재생에 유용한 연골재생용 조성물을 제공한다.
- 34> 상기 양태에서 있어서, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물은 특정 범위의 아피제닌을 함유하고 있고, 이러한 투여량 범위에서 아피제닌은 골관절염의 마커가 되는 증가된 관절활액량 및 활액내의 증가된 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘의 양을 감소시키는 생화학적 효과를 나타내며, 활액막 세포의 상태를 호전시키는 추가적인 관절 연골개선 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.
- 35> 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물에서 유효량의 아피제닌은 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $0.1\mu\text{M}$ 내지 $100\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 한다.
- 36> 바람직하게는, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물에서 유효량의 아피제닌은 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $1\mu\text{M}$ 내지 $80\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 한다.
- 37> 또한, 제2 양태에서, 본 발명은 상기 제1 양태에 따른 관절 연골재생 조성물 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함함을 특징으로 하는, 관절 연골을 재생시켜 골관절염으로 고통받는 환자의 골관절염을 개선시키기 위한 골관절염 치료제를 제공한다.

- <38> 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 골관절염 치료제는 액제, 캡슐제, 과립제, 정제 또는 환제 같은 경구 투여제; 연고제 또는 경피 투여제 같은 국소 적용제; 또는 주사제 형태인 것을 특징으로 한다.
- <39> 또한, 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 골관절염 치료제는 경구 투여제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 10mg 내지 1000mg의 투여량임을 특징으로 한다.
- <40> 또한, 본 발명에 따른 골관절염 치료제가 연고제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 1mg 내지 100mg의 투여량임을 특징으로 한다.
- <41> 또한, 본 발명에 따른 골관절염 치료제가 주사제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 0.1mg 내지 10mg의 투여량임을 특징으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

- <42> 본 발명은 천연 플라보노이드계 물질인 아피제닌 화합물이 연골세포 파손을 지연시키는 공지된 효과 뿐만 아니라, 연골세포의 증식을 촉진하여 연골 조직을 재생시킬 수 있다는 아피제닌의 신규한 용도를 제공한다.
- <43> 본 발명은 또한, 아피제닌이 세포 실험에서 염증관련 효소 활성을 억제하고, 통증유발물질 생성을 억제하는 효과를 나타내고, 관절염유발 동물 모델 실험에서 관절활액 및 활액의 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘의 양을 감소시키는 생화학적 효과를 나타내며, 골관절염 유발 동물 모델의 조직학적 검사에서 연골조직을 재생시키고 활액막 세포의 상태를 호전시키는 등 전반적인 관절 연골재생 효과를 갖고 있어 전반적인 관절 연골재생제로서 탁월한 효과를 갖는다는 것을 확인하였으며, 이로써 아피제닌 화합물의 골관절염의 예방 및 억제제로

서 뿐만 아니라, 실질적으로 아피제닌 화합물의 골관절염 개선 및 치료제로서의 신규한 용도를 제공한다.

:44> 또한, 본 발명은 아피제닌이 항암 작용과 같은 세포독성 및 세포증식억제 효과를 유발하지만, 세포 실험을 통해 특정 농도 범위의 유효 투여량에서는 세포독성 없이 오히려 연골세포 증식을 촉진한다는 사실을 발견하고 이러한 연골재생 효과를 골관절염 유발 동물 모델에서 확인함으로써, 아피제닌의 연골재생 효과가 정확한 투여량 및 환부에 대한 최종 적용량과의 직접적인 상관관계가 있음을 보여준다.

:45> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

:46> 골관절염(osteoarthritis)은 퇴행성 관절 질환(degenerative joint disease)으로서 관절염의 가장 오래되고 가장 일반적인 유형이며, 관절 연골의 파손을 특징으로 한다. 골관절염은 노화의 필연적 결과이고 또한, 비만이 무릎 관절의 골관절염을 야기할 수도 있는 것으로 알려져 있으며, 스포츠, 노동과 관련된 활동 또는 사고로 인해 관절 손상을 입는 경우 골관절염의 발생 위험은 증가할 수 있다. 또한, 무릎 골관절염의 경우, 한쪽 무릎에 골관절염이 생긴 경우, 환자는 통증을 회피하기 위해 반대쪽 무릎을 더 많이 사용하게 되고 결과적으로 많이 사용하게 되는 무릎의 골관절염 유발 가능성이 추가로 높아지게 된다. 따라서, 양쪽 무릎 모두에 대한 골관절염 환자에 있어서, 한쪽 다리에 대한 골관절염 개선은 상대적으로 반대쪽 무릎에 대한 부담을 줄여 줄 수 있어 반대쪽 무릎의 골관절염 악화 위험을 줄이고 이미 발생한 골관절염의 완화에도 긍정적인 영향을 미치는 파급 효과를 갖게 된다.

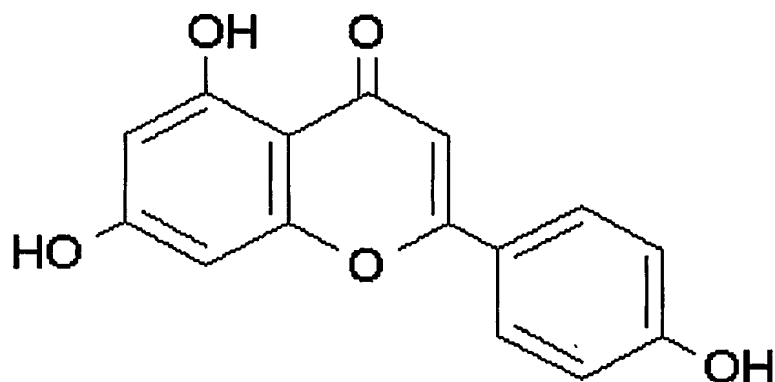
- 47> 또한, 골관절염을 유발하는 연골 파손 과정에서, 일부 염증이 유발될 수 있으며, 이로써 염증 관련 효소의 방출을 야기하여 연골 손상을 가속시킨다. 골관절염이 진행되면, 염증 반응과 함께 활액량이 늘어나는 것을 확인할 수 있는데 이는 연골이 파괴되어 활액내로 프로테오글리칸(proteoglycan)이 방출되기 때문이며, 따라서 활액내의 프로테오글리칸 농도를 감소시키는 것 또한 골관절염의 개선에 중요한 마커가 된다.
- 48> 또한, 골관절염이 유도되면, 관절내 염증 반응과 함께 통증이 증가하게 되는데 이러한 통증은 활액내에서 이와 관련된 중요한 인자인 프로스타글란딘E2의 농도가 증가하기 때문이며, 따라서 활액내의 프로스타글란딘E2의 농도를 감소시키는 것이 또한 골관절염의 개선에 중요하다.
- 49> 또한, 골관절염의 진행에 따라, 관절활액의 활액막 내벽세포(synovial lining cell) 수가 증가하며 내벽의 표면이 매끄럽지 못하고 두께가 두꺼워지는 현상이 일어나는 것으로 알려져 있다[Asari, A. et al., Arch. Histol. Cytol. 61(2): 125-35 (1998)].
- 50> 그밖에, 콜라겐이 관절염 유발과 어느정도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 콜라겐은 관절 연골을 구성하는 물질로서 이러한 콜라겐이 과량 형성되는 것은 연골의 경화를 촉진시키며 관절염 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 정상 수준을 훨씬 상회하는 높은 수준의 콜라겐 수치는 골관절염 유발의 마커가 되며, 이러한 증가된 수준을 감소시키는 것은 골관절염 개선의 마커로서 또한 유용하다.
- 51> 따라서, 이러한 일련의 조직 생화학적 마커들이 감소하는 것은 골관절염 치료에 매우 중요한 작용이며 손상된 조직을 개선시킨다는 간접적인 증거가 된다.

- 52> 또한, 일반적으로 염증 부위에서는 과다한 양의 NO가 발생하여 세포 조직의 괴사를 촉진시킨다고 알려져 있다[Moncada, S. et al., Pharmacol. Rev. 43: 109-142 (1991)]. 이러한 NO를 발생시키는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 활성을 억제하거나 단백질 발현을 억제하는 것은 많은 염증성 질병에서 치료의 중요한 관건이 되고 있다. iNOS는 외부자극에 반응하여 생체를 방어하려는 목적으로 단시간에 과량의 NO를 생성하지만, 관절염과 같은 질환에서는 과잉 분비된 NO가 괴사, 통증 등의 2차적인 부작용을 일으키게 된다. 따라서, iNOS의 과잉 발현 억제는 골관절염 치료에 중요한 것으로 알려져 있다.
- 53> 사이클로옥시게나제 2(cyclooxygenase 2; COX-2)는 통증 유발 물질인 프로스타글란딘을 합성하는 효소이며, 이는 NO를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진되기 때문에 COX-2의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 것은 또한 골관절염 치료에 중요한 마커가 된다.
- 54> 또한, NF κ B 단백질은 상기 언급한 바와 같은 iNOS 및 COX-2 유전자의 발현을 개시하는 전사조절 신호물질로서 평상시에는 I κ B α 라는 단백질과 결합하여 세포질에 존재하다가 감염 등의 외부 자극이 들어오면 I κ B α 가 인산화되면서 분해되어 제거된 후 NF κ B가 핵 안으로 들어가 iNOS의 합성을 개시하도록 유도하게 된다. 따라서, 세포질에 있는 I κ B α 의 인산화 과정 또는 분해 억제는 골관절염 치료를 판단하는 중요한 마커가 된다.
- 55> 또한, NF κ B 단백질은 평상시 세포질에 존재하다가 감염이나 기타 외부 신호가 들어오면 핵 안으로 들어가 iNOS 및 COX-2와 같은 단백질의 유전자 발현을 개시하게 하는 역할을 수행한다. 따라서, NF κ B가 핵 안으로 들어가 해당 유전자의 전사 조절 부위에 결합하는 것을 억제하는 것은 골관절염 환자에서 골관절염 개선을 판단하는 중요한 마커가 된다.
- 56> 아피제닌은 상기 언급된 바와 같은 iNOS, COX-2, NF κ B 활성화 기전 등을 조절하는 역할을 하는 것으로 공지되어져 있다[예를 들면, Lo, A.H. et al., Carcinogenesis 23(6): 983-991

(2002)]. 또한, 아피제닌은 COX-1을 억제하지 않기 때문에 관절염치료제로서 사용되는 경우 기존의 관절염 치료제들이 소화기 장애 등의 부작용을 일으키는 것과는 달리 부작용이 적고, 단일 화합물이기 때문에 지속적으로 재현 가능한 치료 효과를 달성할 수 있을 것이다.

- 57> 천연식물 유래의 플라보노이드류는 페놀계 화합물로써, 구조에 따라 크게 플라보놀(flavonols), 플라바논(flavanones), 플라바놀(flavanols), 플라반(flavans)으로 나뉘어진다. 지금까지 밝혀진 바로는, 플라보노이드는 야채, 과일, 차, 한약재 등에 다양한 형태로 존재하고 있으며, 항바이러스 작용[예를 들면, Kaul, T. N. et al., J. Med. Virol. 15: 71-79 (1985)], 항암 작용[예를 들면, Miller, A. B. et al., Rev. Oncol. 3: 87-95 (1990)], 항염증 작용[예를 들면, Ferrandiz, M. L. et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 1038-1049 (1993)], 항산화 작용[예를 들면, Cao, G. et al., Free Radi. Biol. Med. 22: 749-760 (1997)] 같은 인체에 대한 다양한 효과를 갖는 것으로 공지되어져 있다.
- 58> 플라보노이드의 일종인 아피제닌(apigenin, 4',5,7-트리하이드록시플라본)은 하기 화학식 1의 구조를 갖고 분자량(MW) 270.24이며, 파슬리(Parsley, 0.05% 이상 함유) 및 백리향(Thyme, 0.05%이상 함유) 등을 포함하는 많은 식물 및 과일류에서 발견되는 천연 물질로서, 또한 항염증 작용, 혈관이완 작용, 항산화 작용, 항바이러스 작용, 및 항암 작용 같은 다양한 생물학적 활성을 갖는 물질로 알려져 있다.

<59> 【화학식 1】



60> 항암 작용과 관련하여, 아피제닌은 예를 들면, 약 $50\mu\text{M}$ 이하 정도의 매우 낮은 농도에 서도 효과적으로 작용할 수 있으며, 전립선암, 유방암, 폐암, 직장암, 혈액암(백혈병), 피부암, 갑상선암, 간암 등 다양한 암세포들의 주요 특징인 세포증식(proliferation)과 신생혈 관형성(angiogenesis) 과정에 대해서 세포사멸(apoptosis) 및 괴사(necrosis) 기전에 작용하여 항증식 및 세포독성(cytotoxicity) 효과를 유발하고 결과적으로 암세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.

61> 또한, 아피제닌은 암 세포에서 뿐만 아니라, 쥐의 배 섬유아세포(murine embryo fibroblast) 같은 비종양 세포(non-tumor cell)에서도 종양 억제 단백질 p53의 축적, 세포사멸 유도 같은 세포독성 효과 및 세포증식억제 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 사람의 정상 전립선 상피세포에서도 약간의 세포증식억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다[Plaumann B. et al., Oncogene 13(8), 1605-14 (1996) and Gupta, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 287(4): 914-920].

62> 그러나, 최근에는 폐암 및 직장암 세포주에 대한 아피제닌 적용 농도에 따라, 세포주를 포함하는 *in vitro* 시험에서는 탁월한 효과를 발휘하지만 *in vivo*에서는 거의 효과가 없는 경우도 또한 보고되고 있다[Engelmann, C. et al., *Phytomedicine* 9(6): 489-495 (2002)]. 특히, 세포증식억제 기전을 기초로 하는 아피제닌의 효과는 세포증식억제와 세포독성이 함께 나타날 뿐만 아니라 적용되는 낮은 농도에서 효과에 대한 매우 민감한 반응을 보이는 것으로 확인되고 있다. 그러나, 또한 아피제닌을 포함한 다양한 플라보노이드류의 항산화 효과에 기초한 다양한 실험에서는 세포독성으로부터 보호 또는 예방 효과가 있는 것으로 보고된 예도 있다[Wang, C.N. et al., *J. Biol. Chem.* 276(7): 5287-5295 (2001)].

63> 현재까지 관절염에서의 아피제닌과 연골 사이의 관련성을 언급하고 있는 문헌으로는, 미국 특허 제5,650,433호 및 이의 상용특허를 언급할 수 있다. 상기 인용 특허는 아피제닌을 포함한 플라보노이드 화합물 및 글리코사이드 화합물이 관절 연골 파손에 대해 파손 지연 작용을 하기 때문에 관절증 치료에 사용될 수 있다는 사상을 개시하고 있으나, 이러한 사상에 대한 실시예로서 연골세포 배양물에서 플라보노이드 화합물과 함께 프로테오글리칸 고갈 유도제 (proteoglycan depleting agent)로서 PMA(phorbol myristate acetate)를 처리한 후 프로테오글리칸 고갈 억제 효과만을 측정함으로써 플라보노이드 화합물의 연골보호제(chondroprotective agent)로서의 용도만을 개시하고 있을 뿐, 아피제닌의 연골재생 효과(chondroregenerative effect)를 입증하지는 못했으며, 또한 *in vitro* 실험만을 통해서 프로테오글리칸 고갈 정도를 측정하였을 뿐, 실질적으로 *in vivo* 실험에서 연골보호 효과 뿐만 아니라 연골재생 효과가 있는지도 구체적으로 입증하지 못했다.

- 64> 따라서, 지금까지는 관절 연골세포 증식 및 연골조직 재생에 대한 아피제닌의 효과 및 이러한 효과를 위한 정확한 농도 적용에 대해서는 공지된 바 없었다.
- 65> 또한, 골관절염 유발로 손상된 연골조직을 재생시키고자 하는 경우에는, 상기 항암 작용에서와 같은 세포증식억제와 세포독성유발 기전과 반대의 효과가 발휘되어야 하기 때문에, in vitro 실험에서 연골 세포에 미치는 세포독성 및 세포증식억제 효과 농도가 정확히 확인되어야 하며, 또한 이와 더불어 in vivo 실험을 통해 골관절염 환자에게 적용되는 경우 독성 없이 연골세포 증식 활성을 발휘하는 실질적인 아피제닌 농도가 정확히 확인되어야 한다.
- 66> 본 발명에 이르러, 아피제닌 화합물이 특정 투여량 범위 내에서는 상기 언급된 바와 같은 관절염 유발의 생화학적 마커들을 감소시키는데 있어 보다 우수한 생물학적 활성을 나타내며, 보다 중요하게는 연골보호 뿐만 아니라 연골조직의 재생을 촉진하는 조직학적 효과를 갖는 것을 확인하였으며, 이로써 본 발명의 목적은 아피제닌 화합물의 '연골재생효과 (chondroregenerative effect)'라는 신규한 용도 및 이를 사용한 연골재생제 및 골관절염 치료제를 제공하는 것이다.
- 67> 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 세포독성 없이 연골세포의 증식을 촉진시키기에 유효량의 아피제닌 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 연골재생에 유용한 연골재생용 조성물을 제공한다.
- 8> 상기 양태에서 있어서, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물은 특정 농도 범위의 아피제닌을 함유하고 있고, 이러한 투여량 범위에서 아피제닌은 골관절염 유발 동물 모델에서 골관절염

의 마커가 되는 증가된 관절활액량, 및 활액내의 증가된 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘의 양을 감소시키는 생화학적 효과를 나타내며, 활액막 세포의 상태를 호전시키는 추가적인 관절 연골개선 효과를 갖는 것을 특징으로 한다.

- 69> 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물에서 아피제닌 유효량은 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $0.5\mu\text{M}$ 내지 $100\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 한다.
- 70> 바람직하게는, 본 발명에 따른 연골재생용 조성물에서 아피제닌 유효량은 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $1\mu\text{M}$ 내지 $80\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 한다.
- 71> 또한, 제2 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 상기 제1 양태에 따른 관절 연골재생용 조성물 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함함을 특징으로 하는, 관절 연골을 재생시켜 골관절염으로 고통받는 환자의 골관절염을 개선시키기 위한 골관절염 치료제를 제공한다.
- 72> 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 골관절염 치료제는 액제, 캡슐제, 과립제, 정제 또는 환제 같은 경구 투여제; 연고제 또는 경피 투여제 같은 국소 적용제; 또는 주사제 형태인 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 골관절염 치료제는 주사제이다.
- 73> 또한, 상기 양태에 있어서, 본 발명에 따른 골관절염 치료제는 경구 투여제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 10mg 내지 1000mg의 투여량임을 특징으로 한다.
- 74> 또한, 본 발명에 따른 골관절염 치료제가 연고제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 1mg 내지 100mg의 투여량임을 특징으로 한다.

- <75> 또한, 본 발명에 따른 골관절염 치료제가 주사제인 경우, 아피제닌 유효량이 일일 0.1mg 내지 10mg의 투여량임을 특징으로 한다.
- <76> 본 발명에서 사용되는 용어들은 다음과 같은 의미를 갖는다.
- <77> 본 발명에서 사용된 용어 '약제학적으로 허용되는 담체'란 예기치 못한 독성, 자극 및 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 의학적으로 합당하게 판단되는 범위내에서 사람 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합한 담체를 의미한다. 약제학적으로 허용되는 담체로는 아피제닌 용해를 위한 소량의 DMSO 같은 유기 용매를 함유하는 증류수, 등장성 염수, 링거액 및 주사용수 등을 포함할 수 있다.
- <78> 본 발명에서 사용된 용어 '약제학적으로 허용되는 부형제'는 비독성의 불활성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 임의 유형의 제형 보조제를 의미한다. 약제학적으로 허용되는 부형제로는 예를 들면, 락토오스, 글루코오스, 슈크로오스; 옥수수 전분 및 감자 전분 등의 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예를 들면, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터; 낙화생유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 대두유 등의 천연 식물성 기름; 글리콜 예를 들면, 폴리프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들면, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예를 들면, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 증류수; 등장성 염수; 링거액 (Ringer's solution); 에틸 알코올 및 인산염 완충액을 예시할 수 있으나, 그외에 약제학적 제형에 사용가능한 적합한 다른 비독성 물질을 포함할 수 있다.

- 79> 또한, 추가의 부형제로서, 습윤제, 유화제 및 윤활제 뿐만 아니라 발색제, 방출제, 피복제, 감미제, 향미제, 방향제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- 80> 본 발명에서 사용되는 용어 '연골재생효과(chondroregenerative effect)'는 세포독성 또는 세포증식억제 없이 연골세포의 파손을 억제할 뿐만 아니라 연골세포의 증식을 촉진시키는 본 발명에 따른 아피제닌의 효과를 의미한다.
- 31> 연골재생에 있어서, 용어 '세포독성 없이 연골세포의 증식을 촉진시키기에 유효량의 아피제닌'이란 연골세포의 증식을 필요로 하는 환자에게 투여시 환자에게 독성을 유발하지 않으면서 손상된 연골세포의 증식을 촉진시키는데 효과적인 아피제닌 함량을 의미한다.
- 32> 또한, 골관절염 치료에 있어서, '치료학적 유효량의 연골재생용 조성물'이란 연골 조직의 재생을 필요로 하는 골관절염 환자에게 투여시 손상된 관절 연골을 재생시켜 골관절염을 개선시키는데 효과적인 아피제닌 함량을 함유하는 연골재생용 조성물을 의미한다.
- 3> 본 발명의 조성물 또는 제형에서, '치료학적 유효량'은 1일 총 용량에서 의학적 판단 범위에서 담당의사의 판단에 따라서 결정될 수 있으며, 특정 환자에 있어 특별한 치료학적 유효량 수준은 사용되는 조성물 또는 제형의 형태; 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별 및 섭생; 투여 기간 및 투여 경로; 치료 기간; 혼용되는 약물; 및 의학 분야에 익히 공지된 다른 인자들을 포함한 다양한 인자들에 의해 좌우될 수 있다.
- 1> 본 발명의 골관절염 치료제는 치료학적 유효량의 본 발명의 연골재생용 조성물을 포함한 단위 용량형으로 제공된다. 주사제의 경우, 예를 들면 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁제는 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당해 분야에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사제는 비독성의 비경구적으로 허용되는 담체 또는 용매 중 멸균 주사액, 현

탁액 또는 에멀전일 수 있다. 사용가능한 허용되는 비히클 및 용매에는 물, 링거액, 등장성 염화나트륨 수용액 등이 있다. 또한, 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로 사용되는 멸균 경화유 등을 사용할 수 있다. 주사제는 정맥내, 해면체내, 근육내 피하 및 관내를 통해 주사될 수 있다.

85> 비경구 투여를 위해서는, 멸균 수용액 형태로 사용하는 것이 가장 바람직하며, 이때 상기 용액은 혈액과의 등장성을 갖기 위한, 예를 들면, 염 또는 만니톨, 글루코오스 같은 당류 같은 물질을 함유할 수 있다.

36> 경구 투여용 고체 용량형에는 캡슐제, 정제, 환제, 산제, 및 과립제가 포함될 수 있다. 이러한 고체 용량형에서는 활성 화합물을 예를 들면, 슈크로오스, 락토오스, 또는 전분 같은 하나 이상의 불활성 희석제와 혼합할 수 있다. 또한, 불활성 희석제 이외에 첨가 물질, 예를 들면, 윤활제 및 마그네슘 스테아레이트 및 미세결정성 셀룰로오스 같은 다른 보조제를 포함할 수 있다. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우, 용량형은 완충제를 포함할 수 있다. 정제 및 환제는 추가로 장용피복제 및 다른 방출 조절 피복을 사용할 수도 있다. 연질 및 경질 젤라틴 캡슐제에서는 충전제로서 락토오스 또는 유당(milk sugar) 같은 부형제 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용할 수 있다.

7> 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 용량형은, 피복 및 셸(shell)을 사용하여 제조할 수 있다.

8> 경구 투여용 액체 용량형에는 물과 같은 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제를 포함하는, 약제학적으로 허용되는 에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서제가 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 향미제 및 방향제를 포함할 수 있다.

- 89> 또한, 본 발명의 제형은 국소 또는 경피 투여용 용량형으로서 연고제, 페이스트, 크림, 로션, 젤 또는 패치제(patch)로 제조될 수 있다. 경피 패치의 경우에는 신체에 조성물의 전달량을 조절할 수 있다는 추가의 장점을 갖는다. 이러한 용량형은 화합물을 적절한 매질에 용해시키거나 분산시켜 제조할 수 있다. 피부를 통한 화합물의 흡수를 증가시키기 위해서 흡수촉진제를 사용할 수 있다. 경피 투여제로서 제조하는 경우에는 폴리아크릴산 나트륨, 글리세린, 메틸 파라벤 등의 약제학적으로 허용가능한 습포제 또는 프로필렌 글리콜, 유동 파라핀 및 이소프로필 미리스테이트 등을 함유하는 프라스타 제형 등을 제조할 수 있다.
- 90> 이러한 본 발명의 활성 성분을 함유하는 조성물은 용량 제형에 적합한 방식으로 치료학적 유효량을 투여할 수 있다. 투여량 및 투여 시간은 치료하고자 하는 대상, 치료 대상의 전신계 용량 등에 따라 결정된다. 투여시 요구되는 활성 성분의 양은 담당의사의 판단에 따라 좌우되며 개체에 따라 상이할 수 있다.
- 91> 본 발명의 조성물을 치료 대상에게 투여하는 경우, 용량의 범위는 관절 연골세포의 증식을 촉진시키고 연골 조직을 재생시켜 골관절염 질환 증상을 완화시키는 목적하는 치료 효과를 달성할 수 있는 양이며 치료 대상은 골관절염이 걸릴 수 있는 모든 동물이 포함된다. 일반적으로, 아피제닌 화합물의 관절 연골 재생 효과를 유도하는 수준은 약 0.1 내지 약 100 μM , 바람직하게는 약 1 내지 80 μM , 보다 바람직하게는 약 1 내지 10 μM 로 유지하기에 충분한 양이다. 이러한 투여량 범위에서는 세포독성 및 세포증식억제 없이 연골세포 증식을 촉진시킬 수 있는 양이며, 신체에 부작용을 유발하는 정도로 용량이 많아서 안된다. 예를 들면, 1주일 간격으로 1일 1회 투여시, 경구 투여의 경우에는 일반적으로 10mg 내지 1000mg/일의 단위 용량형으로 투여되고, 주사제의 경우에는 일반적으로 0.1mg 내지 10mg/일의 단위 용량형으로 투여되며, 연고제의 경우에는 일반적으로 1mg 내지 100mg/일의 단위 용량형으로 투여될 수 있으

나, 이로써 제한되지는 않는다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로 개인적인 차이로 인해 그 투여량이 가감될 수 있으며, 이 또한 본 발명의 범위에 해당한다.

- 92> 본 발명자들은 아피제닌의 골관절염 치료제로서의 가능성을 확인하였으나, 아피제닌이 갖는 세포독성 및 세포증식억제라는 상반되는 작용이 선행 기술에서 다수 공지되어져 있기 때문에, *in vitro* 상에서 연골 세포의 증식에 대한 아피제닌의 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 확인하였다. 실험 결과, 세포독성 및 세포증식억제 효과는 약 $10\mu\text{M}$ 이하의 매우 낮은 농도에서 1 ~ 2일 정도 배양하는 경우 거의 나타나지 않았으며 2일 배양시 약 $100\mu\text{M}$ 범위의 IC_{50} 값과 6일 배양시 약 $30\mu\text{M}$ 정도의 IC_{50} 값을 나타내었다. 또한, 1 ~ $10\mu\text{M}$ 범위에서는 약 10 내지 20% 정도의 세포증식 효과가 관찰되었다.
- 93> 상기 *in vitro* 시험 결과를 참조하여, 본 발명자들은 골관절염 유발 동물 모델에서 아피제닌의 연골세포 증식 효과를 측정하고자 하였다.
- 94> 본 발명에서는, 아피제닌의 골관절염 환자에 대한 다양한 생화학적 효과, 조직학적 효과, 및 연골재생 및 활액막 호전 효과를 확인하기 위하여 골관절염 유도된 동물 모델로서 뉴질랜드 흰토끼(New Zealand White Rabbits)를 사용하였다. 뉴질랜드 흰토끼에게 전십자인대 횡절단술(anterior cruiate ligament transection; ACLT)을 시술한 후 폐쇄 공간에서 지속적인 운동으로 실질적인 골관절염을 유발시켰다.
- 95> 골관절염이 유발된 토끼에 대해 다양한 농도의 아피제닌을 주사를 통해 환부에 직접 투여해 본 결과, 대략 0.1 내지 $100\mu\text{M}$, 바람직하게는 1 내지 $80\mu\text{M}$ 의 환부 투여량에서 세포독성 없이 연골조직재생 효과를 발휘하는 것으로 확인되었다. 이러한 농도 범위는 *in vitro* 독성

실험에서의 결과와 동일하지 않으며 따라서 in vitro 실험만으로는 연골재생을 위한 아피제닌의 유효량을 유추하기는 어렵다. 따라서, 본 발명의 실시예 1에서는 약 80 μ M에 해당하는 아피제닌 용액(50 μ l의 DMSO에 아피제닌 50 μ g을 녹인 후 450 μ l의 생리식염수를 혼합한 용액)을 사용하여 골관절염에 대한 아피제닌 효과 실험을 실시하였다.

96> 구체적으로, PBS 대조군 처리와 함께 실험군에서는 상기량의 아피제닌을 매주 1회씩 총 4회 주사하였으며 매 2주마다 관절활액을 채취하여 골관절염의 마커로서 활액량의 변화를 측정하였다.

97> 또한, 생화학적 실험으로써, 이렇게 수득된 관절활액을 사용하여 골관절염의 마커가 되는 프로테오글리칸 함량 변화, 총단백질량 변화, 프로스타글란딘 함량 변화, 콜라겐 함량 변화를 측정하였다. 또한, 관절활액 내에서의 염증 반응의 마커가 되는 산화질소(NO)의 변화량을 측정하고 대식세포주 RAW264.7내에서 LPS-유도된 산화질소 생성에 대한 아피제닌의 효과를 측정함으로써 염증 반응에 대한 아피제닌의 효과를 측정하였다. 또한, 상기 대식세포주에서의 프로스타글란딘 생성에 대한 아피제닌의 효과를 측정하였다.

98> 또한, 대식세포주에서 iNOS, COX-2 및 I κ B α 유전자의 발현에 대한 아피제닌의 효과를 측정함으로써, 아피제닌의 관절염 마커 단백질에 대한 유전자 수준에서의 조절이 가능한지를 또한 측정하였다. 그밖에, NF κ B와 핵내 조절 유전자와의 결합에 대한 아피제닌의 억제 효과를 추가로 측정하였다.

99> 또한, 조직학적 실험으로서, 연골조직의 구조적 변화, 세포수의 변화, 염색약에 의한 염색으로 표면 염색성 분포 등의 퇴행성 변화를 골관절염 진행 정도의 판단 기준인 맨킨스 점수(Mankin's scoring)[Mankin, H. J. et al., Orthopedic Clinics of North America, 2:19-30

(1971)]에 따라 평가하였다. 본 발명에서는 맨킨스 기준에 따라서 두 명의 관찰자에 의한 맹검법으로 실시하였다.

.00> 실시예

.01> 실시예 1: 아피제닌의 세포증식억제 및 세포독성 효과

.02> 아피제닌은 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에서도 세포증식억제 및 세포독성을 갖는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명의 연골세포 증식 효과를 달성하기 위해서는 in vitro 실험에서 연골세포에 대한 세포 독성을 확인할 필요가 있었다.

.03> 따라서, 본 실시예에서는 아피제닌이 연골세포의 증식억제 및 세포독성에 미치는 효과 농도를 결정하기 위해서 뉴질랜드 흰토끼의 연골조직에서 분리한 연골세포에서 아피제닌의 IC₅₀ 값을 결정하였다. 실험은 토끼의 정상 연골조직에서 콜라게나제 처리하여 분리한 연골세포를 이용하였으며, DMSO 중 아피제닌 농도를 각각 1, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 μ M(DMSO 0.05% 이하 함유)까지 처리하고, 1일, 2일, 4일, 및 6일까지 배양한 후 세포의 생존율을 기초로 한 MTT 방법을 적용하여 IC₅₀ 값을 결정하였다.

.04> 그 결과, 1차 배양한 토끼 연골세포에서 아피제닌의 항증식효과에 대한 IC₅₀ 값은 다음과 같았다.

105> 【표 1】

연골세포에 대한 아피제닌의 IC₅₀ 값

처리일수	IC ₅₀ 값
1일	약 200 μ M
2일	약 100 μ M
4일	약 40 μ M
6일	약 30 μ M

06> 특히, 약 10 μ M 이하의 매우 낮은 농도에서는 1일 및 2일 동안 배양된 연골세포에서 유의한 세포증식억제나 세포독성을 관찰할 수 없었으며, 오히려 1 μ M 내지 10 μ M 농도 범위에서는 연골세포에서 약 10 내지 20% 정도의 세포증식효과가 관찰되었다. 따라서, in vitro 실험에서는 연골세포의 증식을 촉진하고 세포독성을 최소화하기 위해서는 10 μ M 이하의 낮은 농도에서 그 연골재생 효과를 기대할 수 있을 것으로 확인되었다.

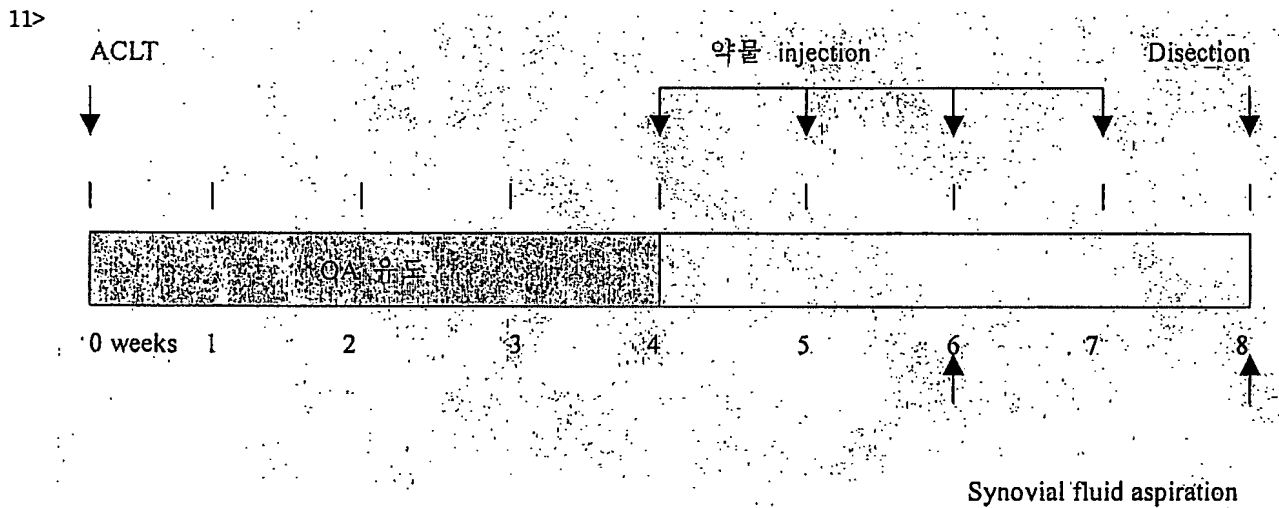
07> in vitro 실험에서 확인된 바와 같이, 아피제닌을 사용한 골관절염 치료에 있어서는 세포증식억제 및 세포독성을 회피할 수 있으면서 항염증효과 및 연골조직재생 효과를 동시에 기대하기 위해서는 아피제닌의 효과적인 농도 결정이 중요한 요소임을 확인하였다.

08> 실시예 2 : 실험동물의 관절염 유도

09> 관절염의 동물모델을 만들기 위해 뉴질랜드 흰토끼의 양쪽 뒷다리 관절부위에 전십자인대 횡절단술(ACLT)을 시술하였다. 수술을 하고 3일 후부터 4주동안 5 X 5 m³의 공간에서 지속적으로 운동시켜 골관절염을 유도하였다. 골관절염이 유도된 토끼를 사용하여 일주일에 한번씩 아피제닌 (A3145, 제조원: Sigma) 50 μ g을 오른쪽 다리만 4회 (즉 4주 실시) 투여하였다.

아피제닌 주사액은 아피제닌 $50\mu\text{g}$ 을 DMSO(dimethylsulfoxide) $50\mu\text{l}$ 와 생리식염수 $450\mu\text{l}$ 를 섞은 용액에 녹여서 제조하였다. 왼쪽 다리는 오른쪽 다리의 대조군이 되며 아피제닌의 효과와 비교하기 위하여 왼쪽 다리에 DMSO $50\mu\text{l}$ 를 포함한 생리적 완충수인 PBS $450\mu\text{l}$ 를 주사하였다. 2주제와 4주제 약물을 투여한지 일주일 후에 관절활액을 뽑아내어 분석하고, 실험이 종료된 후에 토끼의 관절 연골과 활액을 채취하여 실험하였다. 아래의 실시예 3 내지 10까지는 모두 실시예 2의 골관절염이 유도된 뉴질랜드 흰토끼의 관절조직으로 실험한 것이다.

10> 관절염 유도 및 활액 채취 과정



12> 각 실험군의 관절 사진을 도 1에 제시하였다. 도 1에서 제시된 바와 같이, 본 발명에 따른 유효량의 아피제닌을 투여한 토끼에서는 외관상 관절 연골부위의 표면이 매끄러운 반면, 식염수 대조군에서는 관절 연골 손상으로 인해 표면이 매우 불규칙하고 거칠어 진 것을 확인할 수 있었다. 또한, 아피제닌 투여군에서 왼쪽 연골은 대조군으로 처리되었지만, 오른쪽 관절

연골의 상태 개선에 따라 왼쪽 관절에 대한 부담이 적어 왼쪽에서도 어느정도 개선의 효과가 있는 것으로 확인되었다.

.13> 실시예 3 : 관절활액의 총량 측정

.14> 골관절염이 진행되게 되면 일반적으로 염증반응과 함께 활액의 양이 늘어나는 경향을 발견할 수 있다. 정상일 때와 골관절염을 유도한 후 2주째와 4주째 아피제닌 주사 후 1주일 후에 각각 활액을 채취하여 원심분리시킨 후 세포와 혈구 등을 제거하고 상층액만 모아서 실험에 사용하였다.

.15> 골관절염의 정도에 따라 활액의 양에 변화가 있다고 보고되어지고 있어 골관절염 유도과 그 후 약물치료에 의한 활액양의 변화를 알고자 활액의 총량을 측정하였다. 활액의 양을 측정하기 위하여 활액의 Ca^{2+} 의 농도를 비소아조 III 착화 방법(Arsenazo III complexon method)[Michaylova V. et al., Anal. Chim. Acta, 53:194 (1971)]을 이용하여 측정하였고, 활액의 총량은 도난 평형 방정식(Donnan equilibrium equation)을 사용하여 계산하였다. 사용된 비소아조 III 시약(Arsenazo III reagent; 588-3, 제조원: Sigma) 1ml과 관절활액 0.01ml을 섞고 실온에서 5분간 방치 후 600nm에서 흡광도(분광광도계, DU650, 제조원: Beckman)를 측정하였다.

.16> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 2와 도 2에 제시하였으며, 정상군 0.25ml에서 관절염 유도 후 PBS 처리군은 4주 후 1.7ml로 증가하였으나, 아피제닌 처리군은 4주 후 1.16ml로 증가폭이 감소하여 활액증가를 억제하는 현저한 효과를 보였다. 또한, 아피제닌 처리군은 4주째에

왼쪽 다리(-)에서도 1.58ml로 PBS 처리군의 1.91ml에 비해 감소되는 효과를 보였으며, 이는 오른쪽 다리(+)에 대한 파급 효과로 판단된다.

17> 【표 2】

활액 총용적 (ml)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물주사 2 주 후	약물주사 4 주 후
아피제닌	0.25±0.12	1.59±0.32	+ (오른쪽)	1.13±0.08	1.16±0.03
			- (왼쪽)	1.17±0.08	1.58±0.24
PBS	0.26±0.09	1.75±0.11	+ (오른쪽)	1.5±0.22	1.7±0.05
			- (왼쪽)	1.2±0.16	1.91±0.34

18> 실시예 4 : 관절활액의 프로테오글리칸(proteoglycan)양 측정

19> 실시예 3에서 얻은 관절활액을 사용하였으며, 활액내의 프로테오글리칸 농도는 1,9-디메틸메틸렌 블루(1,9-dimethylmethylen blue) 분석법으로 측정하였다[Houselmann H. J. et al., Am. J. Physiol. 271:C742-752, (1996)]. 관절활액 50 μ l와 1,9-디메틸메틸렌 블루(34,108-8, 제조원: Aldrich) 250 μ l를 섞은 후 530nm에서 흡광도 (흡광도측정기, Power Wave X340, 제조원: Bio-Tek)를 측정하였다.

20> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 3과 도 3에 제시하였으며, 프로테오글리칸의 양이 정상인 경우 3.79 μ g/ml에서 골관절염 유도 4주 후 대조군에서는 59.65 μ g/ml로 증가하였으나, 아피제닌 처리군에서는 12.22 μ g/ml로 활액내 증가된 프로테오글리칸 함량이 급감하여 가장 큰 효과를 보였다. 또한, 아피제닌 처리군에서는 PBS 대조군에 비해 왼쪽다리(-)에서도 전반적으로 대조군에 대해 감소 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

21> 【표 3】

활액 프로테오글리칸 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물 주사 2 주 후	약물 주사 4 주 후
아파제닌	3.79 \pm 0.07	5.84 \pm 0.44	+ (오른쪽)	10.32 \pm 0.66	12.22 \pm 0.4
			- (왼쪽)	22.90 \pm 0.86	34.09 \pm 0.24
PBS	3.38 \pm 0.29	3.24 \pm 0.42	+ (오른쪽)	24.42 \pm 0.40	59.65 \pm 0.52
			- (왼쪽)	22.25 \pm 0.22	48.47 \pm 0.49

22> 실시예 5 : 관절활액의 총단백질(total protein)양 측정

23> 골관절염이 진행되면서 연골이 파열되어 활액내로 총단백질이 방출되기 때문에 활액내의 총단백질의 농도를 측정하였다. 실시예 3에서 얻은 관절활액을 사용하였으며, 활액내의 총단백질의 농도는 브래드포드 방법(Bradford method)으로 측정하였다. 관절활액 50 μl 와 단백질 분석시약 (500-0006, 제조원: Bio-rad) 200 μl 를 섞어서 상온에서 5분간 방치한 후 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

24> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 4와 도 4에 제시하였으며, 총단백질의 양이 정상인 경우 4.27mg/ml에서 골관절염 유도 4주 후 대조군에서는 39.74mg/ml로 증가하였으나, 아파제닌 처리군에서는 24.91mg/ml로 증가가 억제되어 큰 효과를 보였다.

25> 【표 4】

활액 총단백질 (mg/ml)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물 주사 2 주 후	약물 주사 4 주 후
아파제닌	4.27 \pm 0.24	53.24 \pm 0.24	+ (오른쪽)	16.64 \pm 0.3	24.91 \pm 0.35
			- (왼쪽)	20.36 \pm 0.69	36.37 \pm 0.1
PBS	4.29 \pm 0.68	53.64 \pm 0.47	+ (오른쪽)	28.02 \pm 0.83	39.74 \pm 0.52
			- (왼쪽)	34.69 \pm 0.36	35.28 \pm 0.53

26> 실시예 6 : 관절활액의 프로스타글란딘E2 (prostaglandin2, PGE2)양 측정

27> 실시예 3에서 얻은 관절활액을 사용하였으며, 활액내의 프로스타글란딘E2의 농도는 효소면역분석키트(enzymeimmunoassay kit, EIA, DE0100, 제조원: R&D systems)를 사용하여 측정하였다. 1/10로 희석된 관절활액 100 μ l, 컨쥬게이트(conjugate) 50 μ l, 항체 50 μ l를 키트에 내장된 플레이트(plate)에 넣고 2시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝나면 세척용 완충액(washing buffer)으로 세척하고 pNPP 용액 200 μ l를 넣어 상온에서 1시간 동안 방치하였다. 반응이 끝난 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

28> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 5과 도 5에 제시하였으며, 프로스타글란딘E2의 양이 정상인 경우 88.05pg/ml에서 골관절염 유도 4주 후 대조군에서는 862.72pg/ml로 증가하였으나, 아피제닌 처리군에서는 196.71pg/ml로 동일기간 PBS 처리 대조군 보다 매우 큰 억제 효과를 나타냈다. 또한, 아피제닌 처리군은 왼쪽 다리(-)에서도 PBS 대조군 753.2pg/ml에 비해 약 509.3pg/ml의 유의한 프로스타글란딘E2의 억제 효과를 보였다.

29> 【표 5】

활액 프로스타글란딘 E₂ (pg/ml)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물 주사 2 주 후	약물 주사 4 주 후
아피제닌	88.05 \pm 0.08	503.98 \pm 0.41	+ (오른쪽)	183.26 \pm 0.2	196.71 \pm 0.52
			- (왼쪽)	543.3 \pm 0.13	509.2 \pm 0.2
PBS	90.6 \pm 0.71	503.51 \pm 0.72	+ (오른쪽)	685.7 \pm 0.54	862.7 \pm 0.36
			- (왼쪽)	571.7 \pm 0.57	753.2 \pm 0.31

30> 실시예 7 : 관절활액의 콜라겐(collagen)양 측정

31> 활액내의 교원질의 총량은 시리우스 레드(Sirius red)를 이용한 분석법으로 측정하였다 [Heide T. R. et al., Histochem. Cell Biol., 112: 271-276 (1999)]. 활액 샘플 100 μ l를 96

웰에 넣어서 34℃ 건조 오븐에서 24시간 동안 코팅한 후 피크르산(picric acid)에 씨리어스 레드(1mg/ml, 36,554-8, 제조원: Aldrich)를 녹인 염색 용액을 100 μ l 넣고 교반기에서 30분 동안 반응시킨 후 남은 염료를 0.01N HCl (H7020, 제조원: Sigma)을 사용하여 제거해 주고 0.1N NaOH (S8045, 제조원: Sigma) 100 μ l에 잘 녹여내어 550nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 교원질의 총량을 분석하였다. 스탠다드(Standard)는 I형 콜라겐(collagen type I; C1188, 제조원: Sigma)을 각각 0, 100, 200, 300, 400, 500 μ g으로 하여 550nm 파장에서 읽은 흡광도를 사용하여 표준 곡선을 그렸다. 이러한 표준 곡선을 이용하여 활액중의 교원질을 정량하였다.

- 32> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 6과 도 6에 제시하였으며, 교원질의 양이 정상인 경우 118.64 μ g/ml에서 골관절염 유도 4주 후 대조군에서는 1912.54 μ g/ml까지 증가하였으나, 아피제닌 처리군에서는 406.56 μ g/ml로 증가폭이 현저히 감소하여 높은 억제 효과를 보였다. 또한, 아피제닌 처리군은 왼쪽 다리(-)에서도 PBS 대조군 1551 μ g/ml에 비해 약 1019.2 μ g/ml의 유의한 활액내 총콜라겐 양의 현저한 억제 효과를 보였다.

33> 【표 6】

활액 총콜라겐 (mg/ml)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물 주사 2 주 후	약물 주사 4 주 후
아피제닌	118.64 \pm 0.64	233.18 \pm 0.03	+ (오른쪽)	397.4 \pm 0.69	406.6 \pm 0.63
			- (왼쪽)	749.4 \pm 0.46	1019.2 \pm 0.79
PBS	119.7 \pm 0.44	233.38 \pm 0.93	+ (오른쪽)	805.9 \pm 0.19	1912.5 \pm 0.7
			- (왼쪽)	734.2 \pm 0.71	1551 \pm 0.64

4> 실시예 8 : 관절조직의 맨킨스 점수(Mankin's scoring)

- 5> 실험대상 동물의 무릎관절의 내측부슬개골 활액막(medial parapatella synovium) 부위에 활액막 조직(synovial tissue)을 30mm의 크기가 되도록 채취하여, 10% 포름산 (F0507, 제조

원: Sigma)에 24시간 이상 고정한 후 파라핀 블록을 제작하여, 4 mm의 박편을 만들어 H&E (hematoxylin & eosin) 염색을 한 후 광학현미경을 사용하여 맨킨스 점수를 부여하였다. 골 관절염의 진행정도를 판단하는 기준으로는 여러 가지가 있으나 주로 쓰이는 방법으로 맨킨스 점수라는 기준이 있다. 이 방법은 연골조직의 구조적 변화, 세포수의 증가 또는 감소여부, 사프란인-O 염색에 따른 표면의 염색성 분포, 최고점(Tidemark)의 연속성으로 나누어 각 항목에 대해 퇴행성 변화를 수치화하여 등급을 나누어 분석하는 방법이다. 맨킨스 점수는 두 명의 관찰자에 의해서 맹검법에 의해 수행되었으며 각 항목이 모두 정상인 상태를 0점으로부터 퇴행성 진행 단계에 따라서 가능한 최대 점수인 14점으로 나누어 퇴행성 변화지수를 산출하였다.

36> 본 실시예에서 측정된 결과는 도 7에 제시하였으며, 관절염 유도 후 대조군의 점수는 평균 12.5였으나, 아피제닌 처리군의 점수는 평균 6.6이었다. 따라서, 아피제닌 처리군에서는 대조군에 비해 2배 정도의 높은 퇴행성 변화지수의 개선을 확인할 수 있었다.

37> 실시예 9 : 관절조직의 H&E, 사프란인-O(Safranin-O) 염색결과

38> 실험 대상 동물의 원위대퇴골을 채취하여 4% 포르말린 (F8775, 제조원: Sigma)에 24시간 이상 고정하고 보고자 하는 면을 5mm 두께로 절편하여 5% 질산 (25, 811-3, 제조원: Sigma)으로 24시간 이상 탈석회를 거쳐 파라핀 블록으로 제작하여 4 μ m의 박편을 만들어 H&E 염색과 연골조직의 특이적 염색인 사프란인-O (S2255, 제조원: Sigma) 염색하여 광학현미경으로 연골의 상태를 관찰하였다.

39> 본 실시예에서 측정된 결과는 도 8에 제시하였으며 도 8A는 아피제닌 처리군의 H&E 및 사프란인-O 염색 결과를 나타내고, 도 8B는 식염수 처리군의 결과를 나타낸다. 사프란인-O 염

색결과 전체적으로 골관절염의 경향을 나타내었으나, 아피제닌 처리군이 대조군에 비해서 연골의 파열정도가 가시적으로 확인가능한 정도로 적으며 프로테오글리칸의 염색도 잘되는 것으로 확인되었다. 아피제닌 처리군의 조직학적 검사 결과, 프로테오글리칸 같은 연골조직 특유의 ECM 합성과 세포의 모양을 가시적으로 판단하는 경우에도 결손된 연골조직 부위가 수복되어 좋은 회복결과를 보였다.

40> 실시예 10 : 활액막 세포의 분포 및 세포수 측정결과

41> 실시예 9의 실험방법과 동일한 방법으로 준비한 조직으로 세포의 수 및 표면을 조사하였다. 본 실시예에서는 깊이를 $120\mu\text{m}$ 로 정하여 그곳에 있는 세포의 수를 측정하였다.

42> 본 실시예에서 측정한 결과는 도 9와 10에 제시하였다. 도 9에 제시된 바와 같이, 아피제닌 처리군의 오른쪽 다리 절단면은 식염수 처리군에 비해 매끄러운 단면을 보여주고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 도 10에서 제시된 바와 같이, 골관절염 유도후 대조군에서는 활액막의 세포의 수가 632.3개이었으나, 아피제닌 처리군은 활액막의 세포의 수가 406.6개로 큰 효과를 보였다. 이는 아피제닌 처리군에서 활액막 세포 수 증가가 약 34.5% 정도 감소 효과를 나타낸다는 것을 보여주었다.

43> 실시예 11 : 관절활액의 산화질소 (nitric oxide, NO)의 양 측정

44> 관절활액에서 NO의 양을 측정하기 위하여 화학적으로 NO의 가장 안정적인 형태인 아질산염(nitrite)으로 환원시켜 그리스(Griess) 반응으로 측정하였다. 관절활액과 그리스 시약(Griess reagent)을 1:1 ($100\mu\text{l}$: $100\mu\text{l}$) 비율로 혼합하고 상온에서 10분간 방치 후 흡광도측

정기 (Power Wave X340, 제조원: Bio-Tek)로 파장 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리스 시약은 설프아닐아미드(sulfanilamide; S9251, 제조원: Sigma) 0.1g, 인산(P6560, 제조원: Sigma) 0.5 ml, N-나프틸-디아민-H-클로라이드 (102397, 제조원: ICN) 0.01g을 최종 부피가 10 ml가 되도록 증류수로 녹여서 만들었다. 아질산염의 정량 곡선은 아질산나트륨(sodium nitrite; S2252, 제조원: Sigma)을 이용하여 작성하였다.

- 15> 본 실시예에서 측정한 결과는 표 7에 제시하였다. 정상일 때 아질산염의 양이 $4.48 \mu\text{M}$ 에서 골관절염 유도 후 대조군에서는 아질산염의 양이 $12.1 \mu\text{M}$ 인데 반해 아피제닌 처리군은 $6.01 \mu\text{M}$ 로 감소하여 좋은 항염증 효과를 보였다.

16> 【표 7】

활액 일산화질소량 변화 (μM)

	정상	OA유도 후 (4주)	처리	약물 주사 2 주 후	약물 주사 4 주 후
아피제닌	4.48 ± 1.18	12.11 ± 0.88	+ (오른쪽)	7.53 ± 4.66	6.01 ± 0.88
			- (왼쪽)	0.65 ± 0.06	5.5 ± 4.59
PBS	4.48 ± 1.18	12.11 ± 0.88	+ (오른쪽)	10.58 ± 2.33	12.1 ± 6.66
			- (왼쪽)	0.65 ± 0.05	6 ± 0.88

- 7> 실시예 12 : 아피제닌이 대식세포의 산화질소 (NO) 생성 억제에 미치는 영향
- 3> 마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7 (KCLB 40071)을 한국세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며, 10%의 소혈청 (fetal bovine serum, 26140-079, 제조원: Gibco), 100U/ml 페니실린, 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 (15140-122, 제조원: Gibco)을 포함한 DMEM (dulbecco's modified eagle medium, 12800-017, 제조원: Gibco) 배지를 포함한 지름 60 mm의 세포 배양 접시에 3×10^6 개의 세포를 접종하고 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 , 습윤조건 하에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에서 산화질소를 유도하기 위하여 대장균의 세포벽 구성 성분인 리포폴리사카라

이드 (lipopolysaccharide, LPS로 약칭됨, L2654, 제조원: Sigma)를 500ng/ml의 농도로 투여하고 대조군에는 용매인 DMSO만 처리하고 실험군에는 아피제닌을 10, 20, 40 80 μ M의 농도가 되도록 투여한 후 16시간 동안 배양하였다. 이때, LPS는 증류수에 녹이고 아피제닌은 DMSO에 녹였다. 그 다음 배지와 그리스 시약을 1:1 (100ml : 100ml)의 비율로 혼합하고 상온에서 10분간 방치한 후 흡광도측정기 (Power Wave X340, 제조원: Bio-Tek)로 파장 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

- 49> 본 실시예 결과는 표 8에 정리하였다. 무처리군이 2 μ M의 산화질소를 생성하는 반면, LPS만을 처리한 경우 40 μ M의 산화질소가 발생하고 아피제닌의 농도에 따라 최대 9 μ M까지 감소하여 in vitro에서도 아피제닌은 뛰어난 항염증 효과를 보였다.

50> 【표 8】

RAW 264.7 세포 배지의 일산화질소

처리조건	아질산염(mM)
무처리	2
LPS(500ng/ml)	40
LPS+아피제닌 10mM	32.2
LPS+아피제닌 20mM	22.2
LPS+아피제닌 40mM	10.1
LPS+아피제닌 80mM	9

- 51> 실시예 13 : 아피제닌이 대식세포의 프로스타글란딘E2 (prostaglandin2, PGE2) 생성 억제에 미치는 영향

- 52> RAW 264.7 세포의 실험조건은 실시예 12과 같다. PGE2 측정을 위하여 R&D systems사의 PGE2 면역분석키트 (DE0100)를 사용하였다. 반응이 끝난 후 배지 100 μ l, 컨쥬게이트 50 μ l, 항체 50 μ l를 키트에 넣고 2시간 동안 반응시킨 후 발색시약인 pNPP 200 μ l를 넣고 1시간 동안 반

응시했다. 반응이 끝나면 흡광도측정기 (Power Wave X340, Bio-Tek사)를 이용하여 파장 405nm에서의 흡광도를 측정하였다.

- 53> 본 실시예 결과는 표 9에 제시하였다. 무처리군이 71pg/ml의 프로스타글란딘을 생성하는 반면, LPS만을 처리 할 경우 4156pg/ml의 프로스타글란딘이 발생하고, 아피제닌 처리군에서는 아피제닌의 농도에 따라 300pg/ml까지 감소하였다.

54> 【표 9】

RAW 264.7 세포 배지의 프로스타글란딘

처리조건	프로스타글란딘 (pg/ml)
무처리	71
LPS(500ng/ml)	4156
LPS+아피제닌 10 μ M	3935
LPS+아피제닌 20 μ M	3918
LPS+아피제닌 40 μ M	1057
LPS+아피제닌 80 μ M	300

- 55> 실시예 14 : 아피제닌이 대식세포의 iNOS, COX-2, I κ B α 의 발현에 미치는 영향

- 56> RAW 264.7 세포의 실험 조건은 실시예 12와 동일하였다. 아피제닌이 대식세포의 iNOS, COX-2, I κ B α 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴 블롯(Western blot)으로 확인하였다. 단, I κ B α 단백질을 관찰할 때는 LPS를 처리하고 2시간 동안만 반응을 시켰다. 배지를 제거하고 추출완충용액(0.32M 슈크로오스 (S0389, 제조원: Sigma), 0.2M Hepes (H3375, 제조원: Sigma), 1mM EDTA (808288, 제조원: BM), 1mM PMSF (P7626, 제조원: Sigma), 10 μ g/ml 아프로티닌 (A1153, 제조원: Sigma), 10 μ g/ml 류펩틴(L0649, 제조원: Sigma), 10 μ g/ml SBTI (T9128, 제조원: Sigma))으로 세포를 분리하여 단백질을 정량한 후 40mg의 단백질을 SDS (sodium dodecyl sulfate) 8-16% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (EC60452, 제조원: NOVEX)을 실시하였다. 전기영동이 끝난 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride, IPVH00010, 제조원

: Millipore) 막에 옮겨 5 % NFD (non fat dry milk) 용액과 반응시키고 1차 항체, 2차 항체를 순서대로 반응시킨 후 ECL (enhanced chemiluminescence, RPN2106, 제조원: Amersham) 시약으로 발색시켜 X-레이 필름 (제조원 : AGFA)에 노출시켰다. 1차 항체로는 iNOS (N32020, 제조원: Transduction) 0.13 μ g/ml, COX-2(sc-1745, 제조원: Santacruz) 2 μ g/ml, β -액틴 (A5441, 제조원: Sigma) 1 μ g/ml, I κ B α (sc-371, 제조원: Santacruz) 0.4 μ g/ml을 사용하였고, iNOS, β -액틴에 대한 2차 항체로는 항-마우스 IgG-HRP (sc-2005, 제조원: Santacruz) 80ng/ml을 사용하였으며, COX-2, I κ B α 에 대한 2차 항체로는 항-토끼 IgG-HRP (sc-2004, 제조원: Santacruz) 80ng/ml을 사용하였다.

57> 본 실시예 결과는 도 11에 제시하였다. 외부 자극이 없는 정상 상태에서는 iNOS의 발현은 전혀 관찰되지 않지만, LPS를 처리하면 100%까지 증가하다가 아피제닌을 처리하면 다시 0% 수준까지 억제되어 매우 좋은 효과를 보였다. 외부 자극이 없는 정상 상태에서는 COX-2의 발현이 전혀 관찰되지 않았지만, LPS를 처리하면 100%까지 증가하다가 아피제닌을 처리하면 0% 수준까지 억제되어 매우 좋은 효과를 보였다.

58> 외부 자극이 없는 정상 상태에서의 I κ B α 의 발현량을 100%로 보았을 때 LPS를 처리하면 18.56%까지 감소하다가 아피제닌을 10 μ M 정도만 처리하면 75.82% 수준까지 회복되는 좋은 효과를 보였다.

9> 실시예 15 : 아피제닌이 대식세포의 NF κ B와 유전자간의 결합에 미치는 영향

0> RAW 264.7 세포의 실시예 조건은 실시예 12와 같다. 다만, 반응시간이 16시간이 아니라 2시간이었다. 아피제닌이 대식세포의 NF κ B와 유전자간의 결합에 미치는 영향을 알아보기

위하여 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 실시하였다. 배지를 제거하고 세포를 분리하여 완충용액 A (10 mM Hepes (H3375, 제조원: Sigma) pH 7.9, 10 mM KCl (P9541, 제조원: Sigma), 1.5 mM MgCl₂ (M2393, 제조원: Sigma), 0.5 mM 디티오쓰레이톨 (D0632, 제조원: Sigma), 0.2 mM PMSF (P7626, 제조원: Sigma), 0.5% Nonidet P-40 (N3268, 제조원: Sigma))로 녹여서 세포막을 파괴한 후 5000rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 침전물에 완충용액 B (20 mM Hepes (H3375, 제조원: Sigma) pH 7.9, 300 mM KCl (P9541, 제조원: Sigma), 1.5 mM MgCl₂ (M2393, 제조원: Sigma), 10% 글리세롤 (G7757, 제조원: Sigma) 0.5 mM 디티오쓰레이톨 (D0632, 제조원: Sigma), 0.2 mM EDTA (808288, 제조원: BM), 0.2 mM PMSF (P7626, 제조원: Sigma))를 넣고 핵막을 파괴한 후 13000rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 핵 내 단백질을 분리해냈다. 미리 합성해 놓은 NF κ B 결합 핵산 올리고머(nucleic acid oligomer, 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 제조원: GenoTech)에 방사성 동위원소인 [γ -³²P]ATP (PB10218, 제조원: Amersham)를 결합시켜 표지를 만들고, 이 핵산 올리고머 0.5ng 과 핵내 단백질 10mg을 반응시켰다. 반응이 완료된 후 결합여부를 확인하기 위해 6% 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 실시한 후 겔을 건조시켜 X-레이 필름에 노출시켰다.

- i> 본 실시예 결과는 도 12에 제시하였다. 정상일 때의 NF κ B의 양을 100이라고 보면 LPS 처리시 186까지 증가하지만, 아피제닌을 같이 처리하면 최대 111(20 μ M 아피제닌 처리시)로 낮아지는 효과를 볼 수 있었다.

【발명의 효과】

- 2> 본 발명은 연골 파손의 마커가 되는 관절활액 총 용적과 활액의 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘 양을 감소시키는 효과, 활액막 세포의 상태를 호전시키는 효과 및 연

골조직을 재생시키는 효과를 갖는, 아피제닌의 관절 연골재생제로서의 신규한 용도를 제공한다. 또한, 관절 연골재생제로서 단일 화합물 아피제닌을 포함하는 골관절염 치료제 및 이를 사용한 골관절염 치료 방법을 제공한다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

세포독성 없이 연골세포의 증식을 촉진시키기에 유효량의 아피제닌 및 약제학적으로 허용되는 담체를 함유함을 특징으로 하는 연골재생에 유용한 연골재생용 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 골관절염 발생의 마커가 되는 증가된 관절활액량 및 활액내의 증가된 프로테오글리칸, 전체 단백질, 프로스타글란딘의 양을 감소시키는 생화학적 효과를 나타내며 활액막 세포의 상태를 호전시키는 효과를 추가로 갖는 것을 특징으로 하는 연골재생에 유용한 연골재생용 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 연골재생용 조성물내 아피제닌 유효량은 연골이 파손된 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $0.1\mu\text{M}$ 내지 $100\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 하는 연골재생용 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 연골재생용 조성물내 아피제닌 유효량은 환자의 관절 연골 조직 및 활액에 최종 농도 $1\mu\text{M}$ 내지 $80\mu\text{M}$ 의 양으로 도달하는 양임을 특징으로 하는 연골재생용 조성물.

【청구항 5】

제1항에 따른 관절 연골재생용 조성물 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함함을 특징으로 하는, 관절 연골을 재생시켜 골관절염으로 고통받는 환자의 골관절염을 개선시키기 위한 골관절염 치료제.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 액제, 캡슐제, 과립제, 정제 또는 환제 같은 경구 투여용 제제; 연고제 또는 경피 투여제 같은 국소 적용 제제; 또는 주사제 형태인 것을 특징으로 하는 골관절염 치료제.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 아피제닌 유효량이 일일 10mg 내지 1000mg임을 특징으로 하는 경구 투여제인 골관절염 치료제.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 아피제닌 유효량이 일일 1mg 내지 100mg임을 특징으로 하는 연고제인 골관절염 치료제.

【청구항 9】

제6항에 있어서, 아피제닌 유효량이 일일 0.1mg 내지 10mg임을 특징으로 하는 주사제인 골관절염 치료제.

【도면】

【도 1】



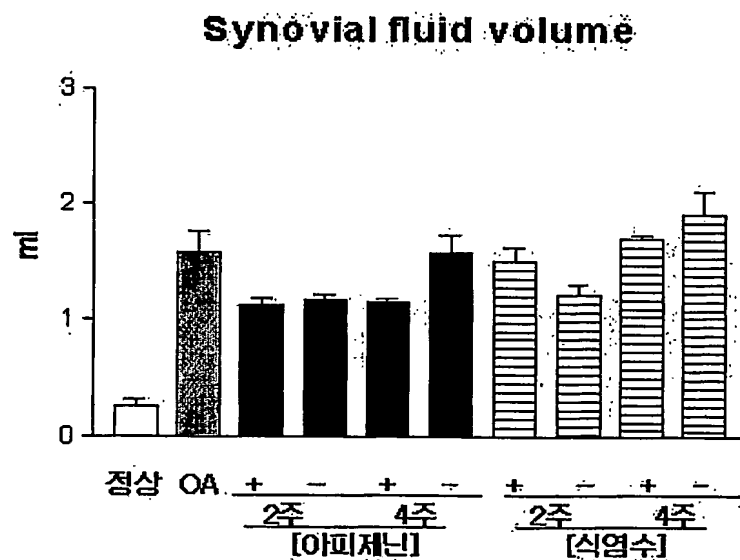
실험군 (아피제닌)



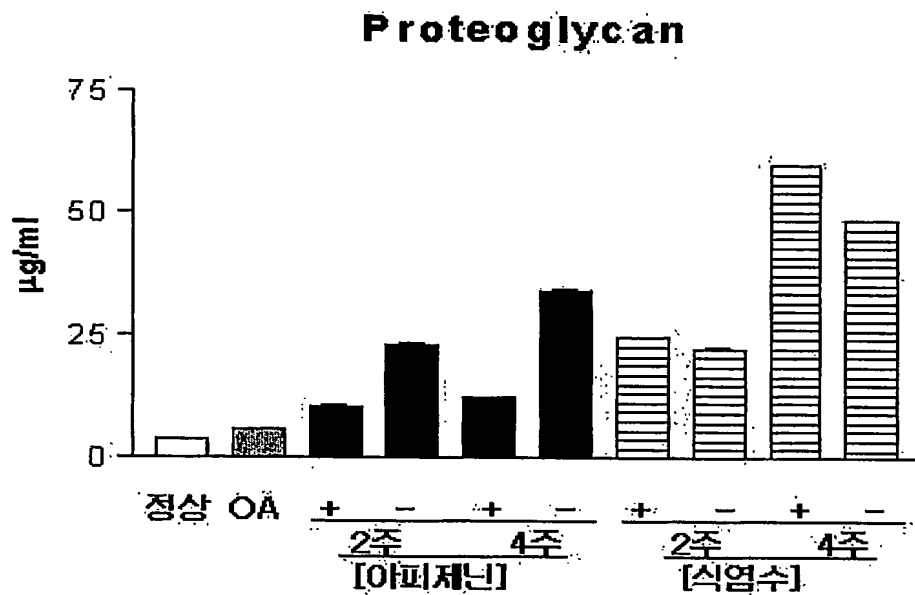
대조군 (식염수)

BEST AVAILABLE COPY

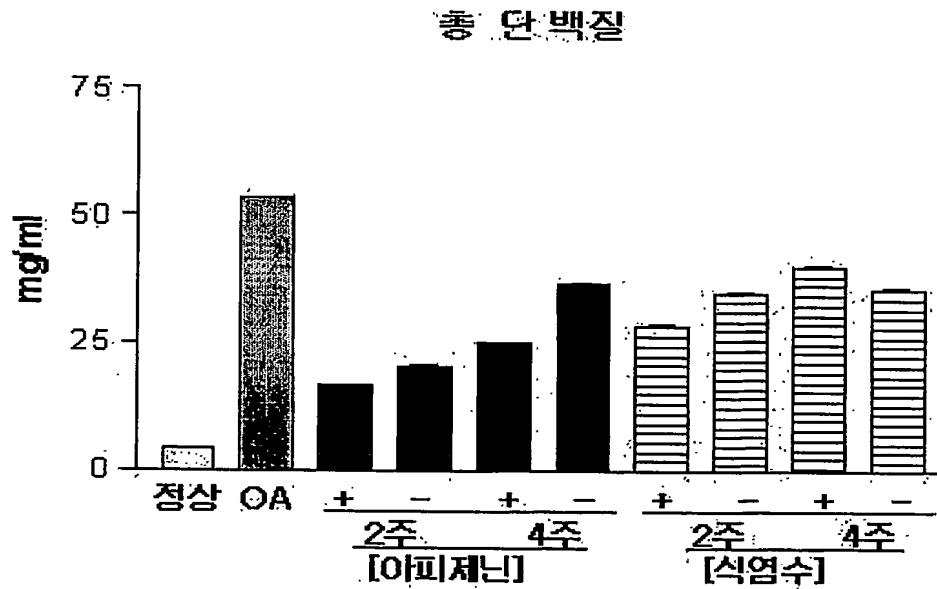
【도 2】



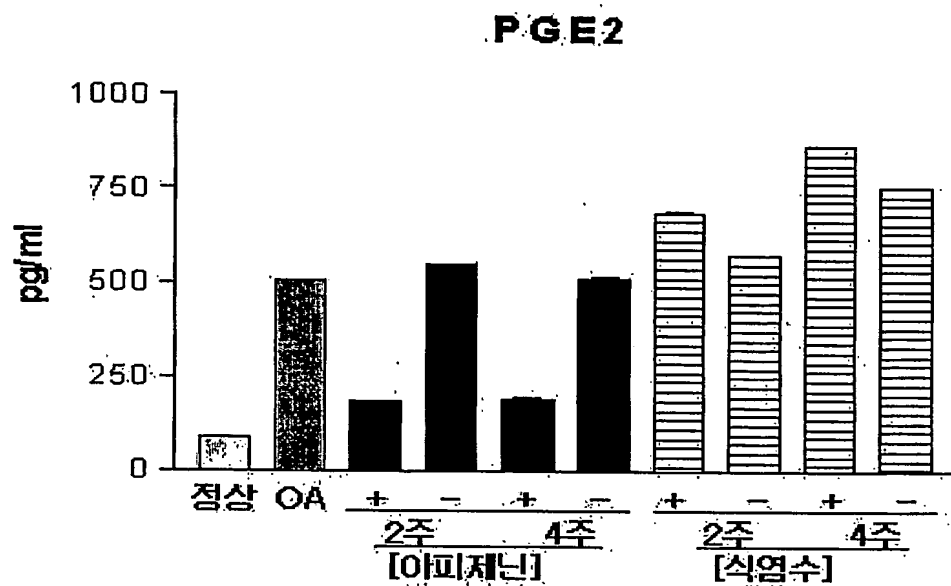
【도 3】



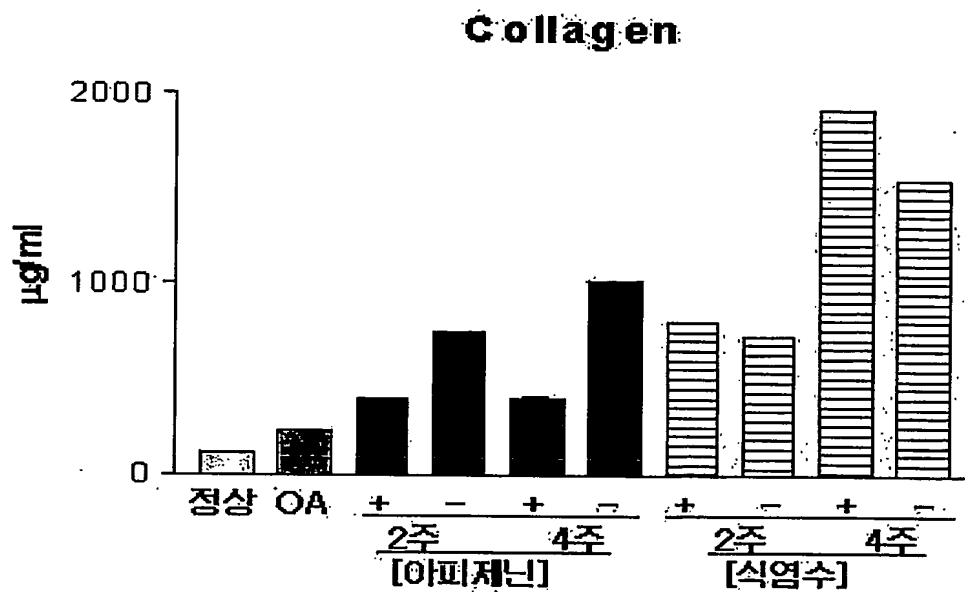
【도 4】



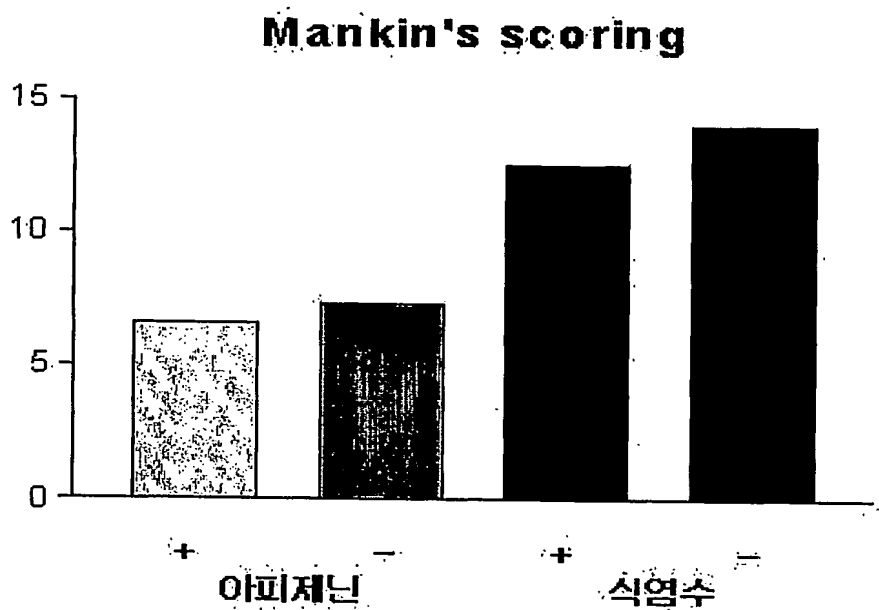
【도 5】



【도 6】

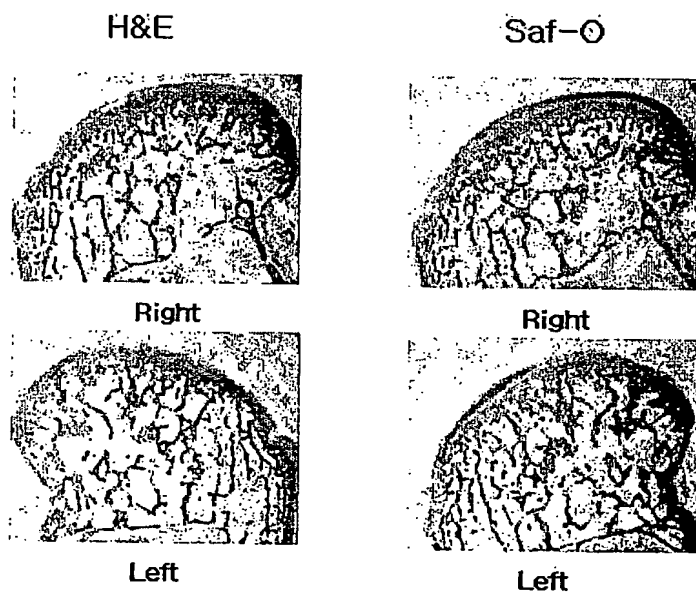


【도 7】



BEST AVAILABLE COPY

【도 8a】



【도 8b】

H&E

Saf-O



Right

Right



Left

Left

BEST AVAILABLE COPY

【도 9】

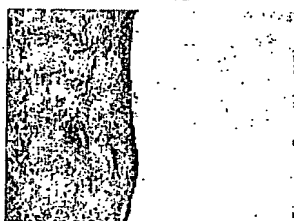
A 아피제닌

B 식염수



Right

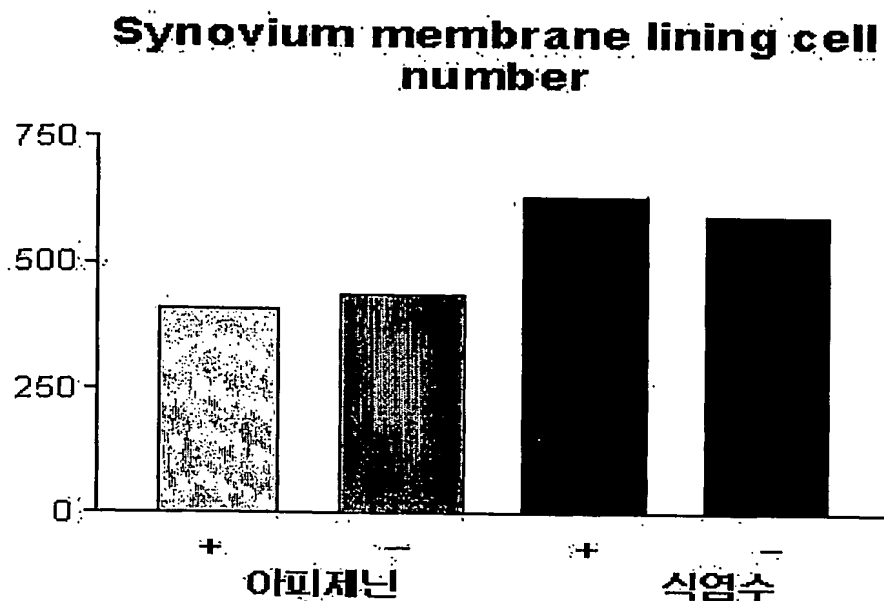
Right



Left

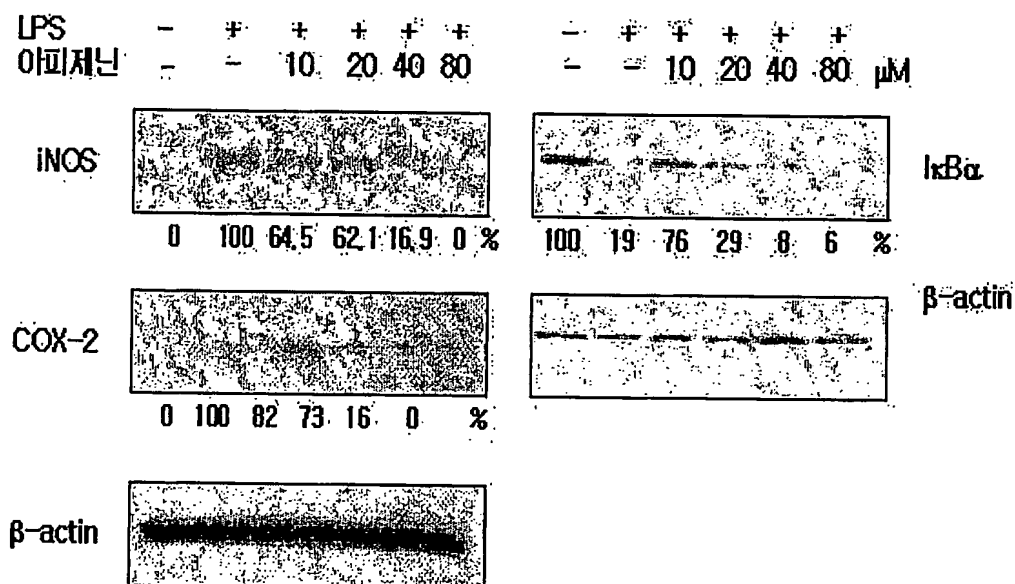
Left

【도 10】



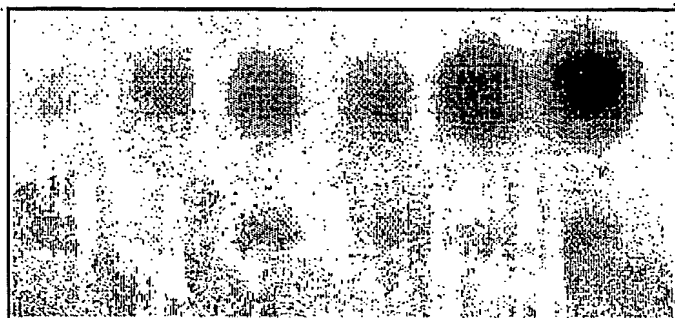
BEST AVAILABLE COPY

【도 11】



【도 12】

LPS	-	+	+	+	+	+
아피제닌	-	-	10	20	40	80 μ M



100	186	146	111	179	228 (%)
-----	-----	-----	-----	-----	---------

BEST AVAILABLE COPY

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002653

International filing date: 15 October 2004 (15.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0071777
Filing date: 15 October 2003 (15.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 19 November 2004 (19.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse